

Toxicology of the food additives BHA and BHT

Citation for published version (APA):

Verhagen, F. J. J. (1989). *Toxicology of the food additives BHA and BHT*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.19890929fv>

Document status and date:

Published: 01/01/1989

DOI:

[10.26481/dis.19890929fv](https://doi.org/10.26481/dis.19890929fv)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

Butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT) are widely used as food additives to prevent oils, fats and shortenings from oxidative deterioration. BHA and BHT are compounds of relatively low toxicity. However, BHA and BHT have both carcinogenic potential. BHA induces hyperplasia, papillomas and carcinomas in the forestomach of rats, hamsters and probably mice. In non-rodents (pigs, monkeys), in the oesophagus proliferation stimulating effects have been reported in response to BHA administration. BHT induces liver tumors in rats and mice. Due to general negative responses in short-term tests for genetic activity, BHA and BHT are considered to be non-genotoxic ("epigenetic") carcinogens. For this class of carcinogenic compounds a threshold for their tumorigenic effects is assumed to exist. Therefore, risk assessment for these food additives is based on the no effect level - safety factor approach. The subsequent establishment of an acceptable daily intake (ADI) for human consumption of BHA and BHT is performed by extrapolating on basis of a dose - body weight comparison of experimental animal vs man, which method does not take specific physiological differences between species in kinetics or biotransformation pathways into account.

This thesis sets out to improve the basis for the estimation of potential health risks associated with human dietary intake of BHA and BHT, focussing on the fate of BHA and BHT in man vs rat, on the mechanism underlying their tumorigenicity in laboratory animals, on the assessment of other target tissues in experimental animals, and on the daily exposure of man to these food additives.

In the introduction the current state of knowledge on BHA and BHT is briefly surveyed. Special emphasis is laid on their toxicity profiles. In part I of the thesis, two methods are presented for the quantitative determination of BHA and BHT in body fluids. Furthermore, a method is described for the rapid determination of the 2- and 3-BHA isomers in a batch. All methods involve high-performance liquid chromatography. In part II, the no-effect level - safety factor approach to determine an ADI for man, is compared with a more physiological approach, based on the concept of concentrations of an agent at (target) tissue sites, as is reflected by plasma levels. Plasma BHT concentrations after a single oral dose of 0.5 mg/kg in man and 20-200 mg/kg in rat were very different. In a similar experiment, plasma levels after administration of a single oral dose of BHA in man (0.5 mg/kg) and rat (200 mg/kg) were within one order of magnitude. In addition, more than 51% of the oral dose of BHA could not be recovered from urine and feces of man, unlike rat, indicating the possibility of bioaccumulation and/or unknown routes of biotransformation of BHA in man.

In order to investigate whether these results imply that oral ingestion of 0.5 mg/kg BHA could induce effects in man, in part III, eight male volunteers ingested this amount of BHA daily for ten consecutive days. In this study, no effects of BHA administration were detected on standard clinical parameters or on general phase-I and -II biotransformation capacity in man. However, the amount of phase-I and -II metabolites of BHA excreted into urine gradually increased towards the end of the experiment. This could either be due to bioaccumulation of (metabolites of) BHA and/or to induction of BHA-specific

biotransformation enzymes in man. This remains to be solved.

In part IV, BHA and BHT were found to possess no mutagenic activity in the Salmonella/microsome assay using new tester strains. In addition, it was shown that it is most unlikely that oxidative cytochrome P-450 -mediated metabolism of BHA into *tert*-butylhydroquinone is involved in the unknown mechanism underlying the induction of proliferation stimulating effects of BHA in experimental animals. In the forestomach of rats, an apparent no-effect level for *ad libitum* fed rats was found at 0.5% BHA in the diet (labelling index) and at 0.75% BHA (potential doubling time). Further, in contrast to data reported by others, proliferation enhancing effects of BHA in other parts of the gastrointestinal tract of rat were detected, indicating that in this species not only the forestomach, but also the oesophagus, glandular stomach, small intestine and large bowel should be considered target tissues for BHA. Consequently, BHA affects not only squamous epithelial cells, but other cell types lining the lumen of the digestive tract as well.

In part V, the maximal possible daily dietary intake of BHA and BHT in the Netherlands was estimated. It is shown that, based on a maximal-approach, it is unlikely that the ADI for BHA is surpassed by man, but that the ADI for BHT may be exceeded in all age and sex groups, and that particularly younger children form a potential risk group.

In conclusion, based on the estimated maximal daily dietary intake of BHA and BHT in the Netherlands in comparison with the current ADI's set for these food antioxidants, as concerns the application of BHA it is not probable that the ADI will be surpassed, unlike BHT. On the other hand, based on their fate in man vs rat, the application of BHT as a food additive may be considered safe, unlike BHA. However, in both instances risk assessment for the consumption of BHA and BHT by man is prone to uncertainties due to the fact that the mechanism underlying their carcinogenicity in rodents is still not understood. Moreover, in case of BHA, the need for further experiments on the unknown mechanism of carcinogenicity is emphasized by the finding that in rat also the oesophagus, glandular stomach, small intestine and colon/rectum should be considered to be potentially target tissues for the proliferation enhancing effects of BHA.

Several suggestions for further research are given. The assessment of the unknown mechanism of the proliferative and carcinogenic potential of BHA in gastro-intestinal tract tissues of laboratory animals, should have primary attention. Similarly, the mode of the carcinogenic action of BHT in the liver of rodents should be unraveled. Future experiments will focus on the induction of heritable changes in DNA, which is a prerequisite for tumor development.

Samenvatting

Butylhydroxyanisol (BHA) en butylhydroxytolueen (BHT) zijn wijd-verbrede voedseladditieven, die gebruikt worden als antioxidant om het ranzig worden van vetten, oliën en vet-bevattende voedingsmiddelen tegen te gaan. De toxiciteit van BHA en BHT is relatief gering. Echter, zowel BHA als BHT zijn kankerverwekkend gebleken bij onderzoek met proefdieren. BHA induceert hyperplasiën, papillomen en carcinomen in de voormaag bij ratten, hamsters en waarschijnlijk ook bij muizen. In niet-knaagdieren, zoals varkens en apen, zijn in de slokdarm proliferatie verhogende effecten beschreven na toediening van BHA. BHT veroorzaakt levertumoren bij ratten en muizen. Omdat BHA en BHT in het algemeen negatieve resultaten laten zien in kortdurende testen voor genetische activiteit, worden BHA en BHT beschouwd als niet-genotoxische, zogenaamde "epigenetische", carcinogenen. Men neemt aan dat er voor deze klasse van chemische carcinogenen een drempelwaarde bestaat voor hun tumor-inducerende werking. Daarom is de risico schatting voor deze voedseladditieven gebaseerd op de geen-nadelig-effect-niveau / veiligheids factor benadering. Een aanvaardbare dagelijkse inneming (ADI) voor menselijke consumptie van BHA en BHT wordt vastgesteld door te extrapoleren op basis van de verschillen in lichaamsgewicht tussen proefdieren en de mens. Deze methode houdt echter geen rekening met specifieke fysiologische verschillen tussen soorten voor wat betreft kinetiek en biotransformatie.

Het doel van het in dit proefschrift beschreven onderzoek was een betere basis te verkrijgen voor het schatten van potentiële gezondheidsrisico's voor de mens bij dagelijkse inneming van BHA en BHT via het voedsel. Er werd vooral aandacht besteed aan de lotgevallen van BHA en BHT in de mens in vergelijking met de rat, aan het onbekende mechanisme dat ten grondslag ligt aan hun carcinogeniteit in proefdieren, aan het onderkennen van andere mogelijke doelwit-weefsels in proefdieren en aan de dagelijkse inneming van deze voedseladditieven door de mens.

In de inleiding wordt de huidige stand van de wetenschap over BHA en BHT in het kort beschreven, waarbij de nadruk is gelegd op hun toxicologische karakteristieken. In deel I van het proefschrift worden twee methoden gepresenteerd voor de kwantitatieve bepaling van BHA en BHT in lichaamsvloeistoffen. Bovendien wordt aangegeven hoe men eenvoudig en snel de verhouding van 2- en 3-BHA isomeren kan bepalen. Alle methoden maken gebruik van hoge-druk vloeistof chromatografie. In deel II wordt de geen-nadelig-effect-niveau / veiligheids factor benadering om een ADI voor de mens vast te stellen vergeleken met een meer fysiologische benadering, die gebaseerd is op de concentratie van een verbinding in het (doelwit) weefsel, welke weerspiegeld wordt door de gehalten in het plasma. Na één enkele orale inneming van BHT door de mens (0,5 mg/kg) en door de rat (20-200 mg/kg) waren de concentraties van BHT in het plasma sterk verschillend. In een gelijksoortig experiment, waarbij de mens en de rat eenmalig een hoeveelheid BHA oraal kregen toegediend, respectievelijk 0,5 en 200 mg/kg, lagen de gemeten gehalten van BHA in het plasma van mens en rat binnen één grootte-orde. Bovendien kon bij de mens, in tegenstelling tot de rat, meer dan 51% van de dosis niet worden teruggevonden in urine en feces. Dit duidt op de mogelijkheid van bioaccumulatie en/of onbekende

biotransformatieroutes van BHA bij de mens.

Om eventuele implicaties van deze bevindingen voor de mens te bepalen werd in een experiment met acht mannelijke vrijwilligers nagegaan of orale inneming van BHA gedurende tien opeenvolgende dagen effecten teweegbracht (deel III). Er werden geen veranderingen gevonden in standaard klinische parameters of in de algemene fase-I en -II biotransformatiecapaciteit van de mens. De in de urine uitgescheiden hoeveelheid fase-I en -II metabolieten van BHA was echter geleidelijk verhoogd tegen het einde van het experiment. Dit kan enerzijds het gevolg zijn van opeenhoping van BHA of metabolieten daarvan in het lichaam of anderzijds van de inductie van specifieke BHA-metaboliserende enzymsystemen bij de mens. Dit zal nog nader onderzocht moeten worden.

In deel IV werd aangetoond dat BHA en BHT geen mutagene activiteit bezitten in de Salmonella/microsoom test. Voorts werd duidelijk dat het erg onwaarschijnlijk is dat metabole omzetting van BHA tot *tert*-butylhydrochinon via het cytochroom P-450 enzym-systeem betrokken is bij de inductie van proliferatie verhogende effecten van BHA in de voormaag van ratten. In de voormaag van ratten werd een schijnbaar geen-effect-niveau voor *ad libitum* gevoerde ratten gevonden bij 0.5% BHA in het voer voor het percentage delende cellen en bij 0.75% BHA voor de potentiële verdubbelingstijd van het weefsel. Voorts werden, in tegenstelling tot bevindingen van anderen, proliferatie verhogende effecten van BHA in andere delen van het spijsverteringskanaal van ratten waargenomen. Dit betekent dat in deze diersoort niet alleen de voormaag, maar ook de slokdarm, maag, dunne en dikke darm beschouwd moeten worden als doelwit-organen voor BHA. Tevens houdt dit in dat BHA niet alleen een effect heeft op plaveisel-epitheelcellen, maar ook op andere celtypen die de wand van het maagdarmkanaal bekleden.

In deel V werd een schatting gemaakt van de maximale dagelijkse inneming van BHA en BHT via het voedsel in Nederland. Gebaseerd op een maximaal-benadering werd aangetoond dat het onwaarschijnlijk is dat men een hoeveelheid BHA binnenkrijgt die hoger is dan de ADI, maar ook dat de ADI voor BHT in alle leeftijdsgroepen en door beide sexen kan worden overschreden. Jonge kinderen vormen een potentiële risicogroep.

Er werd geconcludeerd dat, gebaseerd op de geschatte maximale dagelijkse inneming van BHA en BHT via de voeding in Nederland in vergelijking met de huidige ADI's voor deze antioxidanten, de toepassing van BHA, maar niet van BHT, zodanig is dat de ADI niet overschreden zal worden. Op basis van hun lotgevallen in de mens vs de rat, daarentegen, kan het gebruik van BHT, maar niet dat van BHA, beschouwd worden veilig te zijn voor de mens. Voor beide voedseladditieven is echter de risicoschatting van hun consumptie door de mens onderhevig aan onzekerheden vanwege het feit dat het mechanisme van de carcinogeniteit ervan in knaagdieren niet bekend is. Bovendien wordt ingeval van BHA de vraag naar verdere experimenten omtrent het onbekende carcinogene werkingsmechanisme versterkt door het feit dat in de rat ook de slokdarm, de maag, de dunne en de dikke darm beschouwd kunnen worden als mogelijke doelwitorganen voor de proliferatie stimulerende effecten van BHA.

Tot slot worden suggesties gedaan voor verder onderzoek. Met name zal getracht moeten worden het onbekende mechanisme te ontrafelen dat ten grondslag ligt aan de inductie van proliferatie stimulerende en carcinogene effecten van BHA in het maag-darm kanaal van proefdieren. Eveneens dient de carcinogene werking van BHT in de lever van knaagdieren nader te worden onderzocht. Toekomstig onderzoek moet in eerste instantie gericht worden op de inductie van erfelijke veranderingen in het DNA, aangezien die een voorwaarde zijn voor tumor-ontwikkeling.